

Streszczenie

W minionych latach opisano nowo odkryte białka, zaangażowane w odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA i stres replikacyjny: Uls1 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i kompleks Rrp1-Rrp2 u drożdży *Schizosaccharomyces pombe*. Białka te należą do rodziny translokaz DNA SWI2/SNF2 i wykazują znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasowych do ligazy ubikwityny i translokazy DNA Rad5. Co więcej, dzięki obecnym w ich sekwencjach aminokwasowych motywom interakcji z SUMO, przypuszczalnie są członkami rodziny SUMO-zależnych ligaz ubikwityny (STUbL).

W niniejszej pracy wykazano udział białka Uls1 w odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA na ścieżce związanej z helikazą Sgs1, niezależnie od endonukleaz Mus81-Mms4 i Yen1 oraz częściowo niezależnie od helikaz Srs2 i Mph1. Ponadto udowodniono zaangażowanie białka Uls1 w stabilizację regionu rDNA, razem z helikazą Sgs1. Pokazano, że delecja genu *ULS1* w sposób analogiczny do inaktywacji homologicznej rekombinacji umożliwia supresję letalności podwójnego mutantu *mus81Δ sgs1Δ*. Wykazano także rolę Uls1 jako STUbL, której substratem jest helikaza Srs2. W mutancie *uls1Δ* akumulują się sumoilowane formy Srs2 oraz złagodzony zostaje również toksyczny wpływ nadekspresji genu *SRS2*. Pokazano również, że białko Uls1 wiąże się do PCNA w obrębie widełek replikacyjnych podczas niezaburzonej replikacji. Zaproponowano model działania Uls1, w którym jego rolą jest promowanie interakcji pomiędzy Srs2 a PCNA, co odpowiadałoby za toksyczność Uls1 w mutancie pozbawionym helikazy Sgs1 i śmiertelność komórek podwójnego mutantu *mus81Δ sgs1Δ*.

W drugiej części pracy opisano rolę kompleksu Rrp1-Rrp2 u *S. pombe* w adaptacji do stresu replikacyjnego indukowanego przez hydroksymocznik (HU) na ścieżce niezależnej od mediatorów homologicznej Rad55-Rad57. Wykazano udział Rrp1-Rrp2 w promowaniu zależnego od syntezy DNA łączenia nici (SDSA) razem z helikazą Srs2, na ścieżce homologicznej rekombinacji zależnej od mediatora Swi5-Sfr1. Powyższa aktywność kompleksu Rrp1-Rrp2 oraz helikazy Srs2 umożliwia supresję wrażliwości mutantu *rqh1Δ* na HU po usunięciu genu *rad57+*. Ponadto, dzięki pokazaniu zwiększonej akumulacji ciężkocząsteczkowych białkowych koniugatów SUMO w podwójnych mutantach pozbawionych genów *rrp1+* (*rrp2+*) oraz *rfp1+* (*rfp2+*), genów dla znanych STUbL, uzyskano dowód na potencjalną aktywność kompleksu Rrp1-Rrp2, jako niezależnego enzymu STUbL u *S. pombe*.

1.03.2016 Karol Kramarz

Abstract

In recent years newly discovered proteins involved in DNA damage response and replication stress response, Uls1 from the yeast *S. cerevisiae* and the complex Rrp1-Rrp2 from the yeast *S. pombe*, were characterized. These proteins belong to a family of DNA translocases SWI2/SNF2 and share significant amino acid sequence similarity to the ubiquitin ligase and DNA translocase Rad5. Moreover, due to the presence of SUMO interacting motifs in their amino acid sequence, they are potential members of SUMO-targeted ubiquitin ligases (STUbL).

The data obtained in this doctoral thesis present the evidence of Uls1 activity in DNA damage response in the pathway associated with the helicase Sgs1, parallel to endonucleases Mus81-Mms4 and Yen1, and partially independent of helicases Srs2 and Mph1. In addition, Uls1 is engaged in the stabilization of rDNA region, together with helicase Sgs1. I also showed that deletion of *ULS1* suppresses synthetic lethality of *mus81Δ sgs1Δ* double deletion, in a manner similar to inactivation of homologous recombination. I also demonstrated that Uls1 acts as a SUMO-targeted ubiquitin ligase and the Srs2 helicase seems to be a physiological substrate of Uls1 activity. In support of this notion, sumoylated forms of Srs2 accumulate in the *uls1Δ* mutant whereas and the toxicity of *SRS2* overexpression is alleviated. Moreover, Uls1 binds to PCNA at replication forks during the unperturbed replication. A model explaining Uls1 activity was proposed, in which its role is to promote interaction between Srs2 and PCNA, what presumably contributes to the toxicity of Uls1 in the mutant devoid of Sgs1 helicase and cell death of the *mus81Δ sgs1Δ* mutant.

I also described the role of Rrp1-Rrp2 complex from *S. pombe* in adaptation to replication stress induced by hydroxyurea (HU), in the homologous recombination pathway independent from the Rad55-Rad57 mediator. Moreover, I demonstrated that Rrp1-Rrp2 participates in promoting synthesis dependent strand annealing (SDSA) together with the helicase Srs2, in the Swi5-Sfr1-related pathway of homologous recombination. This activity of Rrp1-Rrp2 enables the suppression of *rqh1Δ* sensitivity to HU after deletion of *rad57+*. Furthermore, I presented a proof of the potential Rrp1-Rrp2 activity as a SUMO-targeted ubiquitin ligase in *S. pombe*, based on the increased accumulation of the heavy molecular weight SUMO conjugates in double mutants devoid of *rrp1+* (*rrp2+*) and *rfp1+* (*rfp2+*) genes.

1.03.2016 Karol Hamar